

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>G01N 33/543, 33/52, 33/576, C12Q 1/68</b>		<b>A1</b>	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 99/05525</b>
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 4. Februar 1999 (04.02.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP98/04533</b>		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, KR, MX, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 20. Juli 1998 (20.07.98)			
(30) Prioritätsdaten: 197 31 465.1 22. Juli 1997 (22.07.97) DE		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 112 - 132, D-68305 Mannheim-Waldhof (DE).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KARL, Johann [DE/DE]; Bert-Schratzlseer-Strasse 7, D-82380 Peissenberg (DE). LENZ, Helmut [DE/DE]; Von-Kühlmann-Strasse 14, D-82327 Tutzing (DE). KRAUSE, Friedemann [DE/DE]; An der Freiheit 108, D-82377 Penzberg (DE). FINCKH, Peter [DE/DE]; Steingraben 8, D-82211 Breitbrunn (DE). HORNAUER, Hans [DE/DE]; Schongauer Strasse 102 e, D-82380 Peissenberg (DE). BERGER, Johann [AT/AT]; Johanna-Kollegger-Strasse 11, A-8020 Graz (AT).			
(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).			

(54) Title: USE OF CHECK SURFACES FOR IDENTIFYING DISTURBING SAMPLES IN A DETECTION PROCEDURE

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON KONTROLLFLÄCHEN ZUR DETEKTION VON STÖRPROBEN IN EINEM NACHWEISVERFAHREN

## (57) Abstract

The invention relates to a solid phase having at least one check surface and containing reactants enabling detection of at least one substance to be analyzed in a sample. The solid phase also comprises one check surface allowing detection of disturbing reactions.

## (57) Zusammenfassung

Es wird eine Festphase mit mindestens einer Testfläche beschrieben, die Reagenzien zum Nachweis von mindestens einem Analyten in einer Probe enthält, wobei die Festphase weiterhin mindestens eine Kontrollfläche zum Nachweis von Störreaktionen umfaßt.

BEST AVAILABLE COPY

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## Verwendung von Kontrollflächen zur Detektion von Störproben in einem Nachweisverfahren

5

### Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine Festphase mit mindestens einer Testfläche zum Nachweis eines Analyten, welche weiterhin mindestens eine Kontrollfläche zum Nachweis von Störungen umfaßt. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zum  
10 Nachweis eines oder mehrerer Analyten unter Verwendung einer erfindungsgemäßen Festphase, wobei Störreaktionen erkannt und gegebenenfalls korrigiert werden können.

Beim Nachweis eines Analyten durch Bindungsassays treten bei manchen Proben  
15 Störungen in der Nachweisreaktion auf, die zu falschen Messwerten führen. Dieses Phänomen wird meist als Matrixeffekt der Probe bezeichnet. In bisher üblichen Testformaten kann das Vorhandensein einer Störung im allgemeinen nicht angezeigt werden. Durch aufwendige Optimierung von Festphase, Testpuffern und Nachweisreagenz wird versucht, die Matrixeffekte der unterschiedlichen Proben  
20 völlig zu unterbinden oder so gering wie möglich zu halten. Eine solche Entstörung von Nachweisverfahren ist jedoch aufwendig und kostspielig. Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei bestimmten Proben trotz Testoptimierung keine ausreichende Entstörung erfolgt, da eine Unterdrückung von Matrixeffekten leider nicht vollständig möglich ist. Weiterhin können neue, bei der Entwicklung des  
25 Nachweisverfahrens unbekannte Störungen auftreten, die ebenfalls zu falschen Ergebnissen führen. Folglich besteht das Problem, dass bei den bekannten Nachweisverfahren falsche Testergebnisse erhalten werden können, ohne dass der Anwender dies erkennt. Besonders tragisch ist dieser Umstand bei den qualitativen Tests zum Nachweis einer Infektionskrankheit. So hat zum Beispiel eine aufgrund  
30 von Matrixproblemen falsch positive Probe bei einem HIV-Test erhebliche Konsequenzen.

US-A-4,558,013 beschreibt einen Teststreifen, der neben mit spezifischen Testreagenzien beschichteten Testregionen eine nicht begrenzte unbeschichtete, negative Kontrollregion enthält. Der Messwert in der Testregion wird durch Subtraktion der unspezifischen Bindung in der Kontrollregion korrigiert. Durch eine solche Vorgehensweise können Störungen allerdings nur zum Teil korrigiert werden, da sich die unspezifische Bindung von Störkomponenten an die Testregion zumeist beträchtlich von der Bindung von Störkomponenten an die unbeschichtete Kontrollregion unterscheidet.

10 US-A-5,356,785 beschreibt eine Festphase mit mehreren Testflächen, die jeweils verschiedene Mengen eines Festphasenrezeptors zum Nachweis eines Analyten enthalten. Weiterhin enthält die Festphase eine Referenzfläche, die mit dem Testreagenz ein nachweisbares Signal bekannter Stärke liefert. Kontrollflächen zur Bestimmung unspezifischer Wechselwirkungen zwischen der Probe und der  
15 Festphase werden nicht offenbart.

US-A-4,916,056 (Brown III et al.) beschreibt eine Festphase zur qualitativen oder quantitativen Bestimmung eines Analyten, insbesondere eines Antigens, Antikörpers oder eines DNA-Segments in einer Probe. Die Festphase enthält neben einer  
20 Testfläche eine Referenzfläche, die ein positives Signal im Test ergibt, sowie eine nicht begrenzte negative Kontrollfläche, in der die positive Referenzfläche und die Testfläche enthalten sind. Ein Nachteil dieser Vorrichtung besteht darin, daß sich die Oberfläche der unbeschichteten Kontrollregion zu stark von der Testfläche unterscheidet, um eine wirksame Korrektur von Störungen zu erreichen.

25 Eine Aufgabe der Erfindung war es daher, die Vorrichtungen und Verfahren zum Nachweis von Analyten bereitzustellen, die einen direkten Hinweis auf das Vorhandensein und gegebenenfalls die Art von Störungen ermöglichen, so daß diese Störungen bei der Auswertung der Testergebnisse berücksichtigt werden können.

30 Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch eine Festphase mit mindestens einer begrenzten Testfläche zum Nachweis eines Analyten in einer Probe, welche

dadurch gekennzeichnet ist, daß die Festphase weiterhin mindestens eine begrenzte Kontrollfläche zum Nachweis von Störungen umfaßt. Unter "begrenzten Testflächen" auf einer Festphase ist dabei zu verstehen, daß die Testflächen definierte Bereiche der Festphase umfassen, die vorzugsweise durch inerte Bereiche von weiteren Testflächen räumlich getrennt sind. Die begrenzten Testflächen haben bevorzugt einen Durchmesser von 10  $\mu\text{m}$  bis 1 cm und besonders bevorzugt 10  $\mu\text{m}$  bis 5 mm. Am meisten bevorzugt sind miniaturisierte Testflächen mit einem Durchmesser von 10  $\mu\text{m}$  bis 2 mm. Bevorzugt sind Festphasen mit mehreren Testflächen, die auch als Array-Systeme bezeichnet werden. Solche Array-Systeme sind z.B. bei Ekins und Chu (Clin. Chem. 37 (1995), 1955-1967) und in den US-Patenten 5,432,099, 5,516,635 und 5,126,276 beschrieben. Array-Systeme haben den Vorteil, dass mehrere Analyt- und Kontrollbestimmungen gleichzeitig an einer Probe durchgeführt werden können. Durch die Verwendung von Kontrollflächen zur Detektion von unspezifischen Bindungen und/oder Störproben kann die Ergebnissicherheit gerade bei miniaturisierten Array-Testsystemen erheblich verbessert werden.

Besonders interessant ist dabei die Erfassung von Störungen und unspezifischen Bindungen bei qualitativen Tests und insbesondere bei solchen mit hohen Anforderungen an die Spezifität, wie etwa bei Tests auf Infektionen (z.B. HIV). Durch Anzeigen einer Störung und Korrektur des Meßwerts können falsch positive Ergebnisse deutlich reduziert und somit die Spezifität enorm verbessert werden.

Die erfindungsgemäße Festphase ist ein beliebiger, für Nachweisverfahren gebräuchlicher Träger, vorzugsweise ein nichtporöser Träger, z.B. ein Träger mit Kunststoff-, Glas-, Metall- oder Metalloxydoberfläche. Auch poröse Träger wie etwa Teststreifen sind geeignet. Auf diesem Träger sind räumlich diskrete Bereiche (Testflächen) angeordnet. Auf diesen Testflächen sind immobilisierte Festphasenrezeptoren aufgebracht. Die Immobilisierung der Festphasenrezeptoren erfolgt nach bekannten Methoden, z.B. durch direkte adsorptive Bindung, durch kovalente Kopplung oder durch Kopplung über hochaffine Bindepaare, z.B. Streptavidin/-Biotin, Antigen/Antikörper oder Zucker/Lectin. Durch spezifische Bindung von

Komponenten aus dem Nachweismedium, z.B. des zu bestimmenden Analyten oder eines Analytanalogons, an den Festphasenrezeptor kann das Vorhandensein oder/und die Menge des Analyten in einer Probe bestimmt werden.

- 5 Der Nachweis des Analyten und des Vorhandenseins von Störreaktionen erfolgt im erfindungsgemäßen Verfahren auf bekannte Weise durch Verwendung von geeigneten Markierungsgruppen, z.B. Fluoreszenzmarkierungsgruppen. Alternativ kann - bei geeigneten Festphasen - die Wechselwirkung von Bestandteilen des Nachweismediums mit den Test- und Kontrollflächen auch durch Bestimmung der
- 10 Schichtdicke der jeweiligen Fläche, z.B. durch Plasmonenresonanzspektroskopie, nachgewiesen werden.

Bei Array-Systemen, in denen ein gleichzeitiger Nachweis mehrerer Analyten aus einer Probe erfolgt, ist die Verwendung einer "universellen" Markierungsgruppe

15 bevorzugt, mit der ein gleichzeitiger Nachweis mehrerer verschiedener Analyten an verschiedenen Testflächen möglich ist. Ein Beispiel für solche universellen Markierungsgruppen sind Markierungsgruppen, die einen Rezeptor tragen, welcher eine spezifische Wechselwirkung (z.B. über ein hochaffines Bindepaar wie etwa Antikörper/Antigen oder Streptavidin/Biotin etc.) mit einem komplementären Rezeptor auf

20 einem Testreagenz, z.B. einem löslichen Rezeptor für einen zu bestimmenden Analyten oder ein Analytanalogon eingehen kann.

Die Anwendung einer solchen universellen Markierungsgruppe ist exemplarisch in Abbildung 1 erläutert. Dort wird ein fluoreszierendes Latexbead, welches mit einem

25 Anti-Digoxigenin-Antikörper gekoppelt ist (<Dig> Label), für drei verschiedene Testformate auf einer einzigen Festphase, nämlich für die Bestimmung von HIV-Antikörpern, HBs-Antigen und Anti-HBc-Antikörper, eingesetzt. Bei der Anti-HIV-Antikörperbestimmung wird ein immobilisiertes HIV-Antigen und ein digoxigenyliertes lösliches HIV-Antigen verwendet, die mit den nachzuweisenden Anti-HIV-

30 Antikörpern einen immobilisierten Immunkomplex bilden. An die auf diesem Immunkomplex vorhandenen Digoxigeningruppen kann die Markierungsgruppe binden. Bei der Bestimmung von HBs-Antigen werden auf entsprechende Weise

- 5 -

ein immobilisierter Antikörper und ein digoxigenylierter löslicher Antikörper, der mit der Markierungsgruppe wechselwirken kann, verwendet. Bei der Anti-HBc-Bestimmung wird ein kompetitives Testformat verwendet, bei dem in der Probe vorhandene Anti-HBc-Antikörper mit einem digoxigenylierten Anti-HBc-Antikörper um  
5 immobilisiertes HBc-Antigen konkurrieren. Die an die Testfläche gebundene Menge der Markierungsgruppe ist indirekt proportional zur Anti-HBc-Konzentration in der Probe.

Begrenzte Test- und Kontrollflächen können darüber hinaus zur Unterscheidung  
10 gegenüber inerten Bereichen der Festphase eine nachweisbare und analytunspezifische Markierungsgruppe enthalten, die neben der analytspezifischen Markierungsgruppe nachweisbar ist und nicht mit ihr interferiert. Ein Beispiel für eine solche analytunspezifische Markierungsgruppe ist eine Fluoreszenz-Markierungsgruppe, die bei einer Wellenlänge fluoresziert, die von der Fluoreszenzwellenlänge  
15 einer analytspezifischen Markierungsgruppe verschieden ist. Die analytunspezifische Markierungsgruppe wird vorzugsweise - ebenso wie der Festphasenrezeptor - über ein hochaffines Bindepaar, z.B. Streptavidin/Biotin immobilisiert.

Die erfindungsgemäße Festphase kann in beliebigen Nachweisverfahren eingesetzt werden, z.B. in Immunoassays, Nukleinsäure-Hybridisierungsassays, Zucker-  
20 Lectin-Assays und ähnlichen Verfahren.

Die erfindungsgemäße Festphase ermöglicht selbst dann einen Nachweis von Störreaktionen zum Erhalt von zuverlässigen Testergebnissen, wenn die aus dem  
25 Stand der Technik bekannten Entstörungsmaßnahmen für bestimmte Proben nicht ausreichen. Die Kontrollflächen ermöglichen nicht nur einen qualitativen Nachweis von Störreaktionen sondern auch in vielen Fällen eine quantitative Korrektur der Störung.

30 Zum Nachweis unterschiedlicher Störungen kann die Festphase mehrere, insbesondere unterschiedliche Kontrollflächen zum Nachweis von Störreaktionen umfassen. Auf diese Weise können verschiedene Arten von Störungen spezifisch

erfaßt werden. Es empfiehlt sich insbesondere eine Reihe von Kontrollflächen aufzubringen, die zum Nachweis von häufig auftretenden oder/und für den jeweiligen Test besonders relevanten Störkomponenten geeignet sind.

- 5 Störungen von Testverfahren können im allgemeinen durch unerwünschte, nicht-analyspezifische Wechselwirkungen von Substanzen auf der Testfläche mit Komponenten des Nachweismediums auftreten. Als Substanzen auf der Testfläche kommen dabei insbesondere Bestandteile der Festphase, Teile des Festphasenrezeptors sowie weitere, sich auf der Oberfläche der Festphase befindende Reagen-
- 10 zien in Betracht. Die störenden Komponenten des Nachweismediums stammen vor allem aus der Probe (Matrixeffekt) und führen in manchen Fällen zur unspezifischen Bindung von Testreagenzien, z.B. dem Nachweisreagenz an die Festphase und führen zur Verfälschung des Meßsignals. Somit kommen störende Wechselwirkungen zwischen der Testfläche und Probekomponenten, Testreagenzien,
- 15 Reaktionsprodukten oder Komplexen von Probekomponenten und Testreagenzien in Betracht.

Die erfindungsgemäße Festphase umfaßt bevorzugt Kontrollflächen zum Nachweis von Störungen, die durch eine unerwünschte Bindung von Komponenten des

20 Nachweismediums an den für den Analyten spezifischen Festphasenrezeptor hervorgerufen werden. In Proben liegen häufig Analyt-fremde Störbestandteile, wie etwa Antikörper oder Antigene vor, die zu einer erhöhten unspezifischen Bindung mit dem Festphasenrezeptor neigen und auf diese Weise zu fehlerhaften Testergebnissen führen. Besonders vorteilhaft ist deswegen eine Kontrollfläche, welche

25 einen nicht-analyspezifischen Festphasenrezeptor umfaßt, der mit Ausnahme der spezifisch mit dem Analyten bindefähigen Region völlig identisch mit dem Festphasenrezeptor in den Testflächen ist.

Wenn der Festphasenrezeptor beispielsweise ein Antikörper oder ein Antikörper-

30 fragment ist, verwendet man eine Kontrollfläche, die einen unspezifischen Antikörper oder ein unspezifisches Antikörperfragment der gleichen Spezies, bevorzugt der gleichen Klasse und besonders bevorzugt der gleichen Subklasse wie der



- 7 -

Festphasenrezeptor der Testfläche enthält. Wenn der Festphasenrezeptor beispielsweise ein Antigen, z.B. ein Peptid oder ein Polypeptid ist, verwendet man eine Kontrollfläche, die ein mutiertes "Antigen" enthält, welches sich von einem immunologisch reaktiven Antigen durch Veränderungen, z.B. durch Veränderung  
5 einer möglichst geringen Anzahl Aminosäuren im Bereich immunogener Epitope unterscheidet. Diese Aminosäureveränderungen können Insertionen, Deletionen und vorzugsweise Substitutionen natürlicher Aminosäuren durch andere natürliche Aminosäuren oder nicht natürliche Aminosäurederivate, z.B. D-Aminosäuren umfassen. Wenn der Festphasenrezeptor beispielsweise eine Nukleinsäure ist,  
10 verwendet man eine Kontrollfläche, die eine "mutierte" Nukleinsäure enthält, die sich von der auf der Testfläche immobilisierten Nukleinsäure durch Veränderungen in der Nukleotidsequenz, beispielsweise durch einen Basenaustausch innerhalb der für die Erkennung einer Zielnukleinsäure verantwortlichen Sequenz, vorzugsweise in deren Mitte, unterscheidet. Am meisten bevorzugt wird ein Mutein des  
15 Festphasenrezeptors verwendet, welches mit Ausnahme der analytspezifischen Antigenbindungsstelle völlig identisch mit dem Festphasenantikörper in den Testflächen ist.

Bevorzugt ist auch, wenn der auf die Kontrollfläche aufgebrachte Festphasenrezeptor identische Behandlungsschritte, z.B. Derivatisierungen, wie der auf die Testfläche aufgebrachte Festphasenrezeptor durchlaufen hat. So sollte, beispielsweise  
20 - bei einem biotinylierten Festphasenrezeptor - die Zahl der an den Festphasenrezeptor angekoppelten Biotinmoleküle in der Testfläche und der Kontrollfläche gleich sein. Weiterhin sollten die Festphasenrezeptoren in der Testfläche und der  
25 Kontrollfläche eine identische Kopplungschemie durchlaufen haben. Außerdem sollten auch identische Linker verwendet werden. Ein für eine Kontrollfläche geeigneter Festphasenrezeptor darf keine spezifische Bindefähigkeit für den Analyten aufweisen, umfasst aber vorzugsweise alle anderen Bereiche und somit Bindestellen des Festphasenrezeptors der Testfläche. Somit ist die unspezifische  
30 Bindung von Störkomponenten an den jeweiligen Festphasenrezeptor der Testfläche und Kontrollfläche im wesentlichen identisch, so dass eine quantitative

Korrektur des Meßwertes der Testfläche anhand des Meßwertes der Kontrollfläche vorgenommen werden kann.

- Bevorzugt umfaßt die Festphase weiterhin mindestens eine Kontrollfläche zum
- 5 Nachweis von Störungen, die durch die Reaktion anderer immobilisierter Reagenzien in den Testflächen mit Nicht-Analytkomponenten der Probe hervorgerufen werden. Dadurch werden insbesondere Störkomponenten erfaßt, die spezifisch oder/und unspezifisch mit Komponenten der zum Aufbringen des Festphasenrezeptors verwendeten Beladelösung reagieren. Eine solche Kontrollfläche kann
- 10 beispielsweise bei einem Testsystem verwendete Reagenzien der Beladelösung wie etwa Puffer, Immobilisierungsreagenzien, wie Streptavidin, biotinylierte Substanzen, z.B. biotinylierte Fluoreszenzmarker, nicht-analyspezifische Antikörper etc., Blockierungsreagenzien oder Linker, enthalten.
- 15 Oftmals werden Tests durch Rheumafaktoren gestört. Daher ist es bevorzugt, mindestens eine Kontrollfläche zum Nachweis auf Rheumafaktoren auf die Festphase aufzubringen. Rheumafaktoren sind zumeist IgM-Moleküle, seltener auch IgG-, IgA- und IgE-Moleküle, die mit dem Fc-Teil von Antikörpern reagieren und - wenn sie z.B. eine Kreuzreaktion mit dem auf der Testfläche immobilisierten
- 20 Antikörper oder/und einem löslichen Nachweisantikörper zeigen - den Test stören, z.B. durch Vernetzung des Festphasen-gebundenen Antikörpers mit einem markierten Nachweisantikörper, wodurch ein unspezifisch erhöhtes Signal erhalten wird. Für eine entsprechende Kontrollfläche wird ein unspezifisches IgG-Molekül, bevorzugt der Fc $\gamma$ -Teil eines humanen IgG-Moleküls auf die Festphase aufge-
- 25 bracht. Während des Tests bindet dann der Rheumafaktor nicht nur an die Testfläche, sondern auch an die Kontrollfläche und zeigt so die Störung an.

Eine weitere relativ häufig auftretende Störung wird durch fremdspezies-spezifische Antikörper in der Probe, d.h. Antikörper, die gegen Antikörper fremder

30 Spezies gerichtet sind, z.B. humane Anti-Maus-Antikörper (HAMA), hervorgerufen. Daher umfaßt die erfindungsgemäße Festphase bevorzugt auch mindestens eine Kontrollfläche zum Test auf fremdspezies-spezifische Antikörper. Fremdspezies-

spezifische Störkomponenten, z.B. HAMA führen beispielsweise in einem Doppel-Antikörper-Sandwich-Assay zu einer Vernetzung des Festphasen-Antikörpers mit dem Nachweis-Antikörper und folglich zu einem unspezifisch erhöhten Signal. Für eine geeignete Kontrollfläche wird bevorzugt ein unspezifischer Antikörper derselben Spezies wie der Testantikörper verwendet. Eine möglicherweise in der Probe vorhandene HAMA-Störkomponente bindet an den auf die Kontrollfläche aufgetragenen Antikörper, wodurch die Störreaktion angezeigt wird.

Anstelle eines Festphasenrezeptors, welcher mit dem Nachweisreagenz in der Testfläche, abgesehen von der spezifisch analytbindefähigen Region, identisch ist, kann auf eine Kontrollfläche auch der bei der Nachweisreaktion gebildete Komplex, z.B. Festphasenantikörper-Analyt-Nachweisantikörper (ohne Markierung), aufgebracht werden, so dass keine spezifische Reaktion mehr möglich ist, während die unspezifischen Bindungsstellen nahezu identisch mit denen der Testfläche sind.

Es sind auch Störkomponenten in Serum bekannt, die gegen Neo-Epitope eines Antikörperfragments gerichtet sind. Solche Neo-Epitope entstehen z.B. bei der  $F(ab')_2$ -Spaltung eines IgG-Moleküls. Hier ist es bevorzugt, eine Kontrollfläche vorzusehen, die ein Fragment eines unspezifischen Antikörpers enthält, welches mit derselben Methode (Spaltbedingungen und Spaltprotein) hergestellt wurde, wie die Antikörperfragmente der Testfläche. Die Störkomponenten binden an diese unspezifischen Antikörperfragmente, wodurch sie nachgewiesen werden können.

Außerdem besteht die Möglichkeit, mit geeigneten Kontrollflächen auch gegebenenfalls in einer Probe vorliegende Störkomponenten, z. B. Störantikörper zu erfassen, die gegen Immobilisierungsreagenzien auf den Testflächen wie Streptavidin gerichtet sind. Hierzu wird Streptavidin (SA) auf eine Kontrollfläche aufgebracht und dem Nachweisreagenz markiertes SA zugesetzt. Bei Anwesenheit von Anti-SA-Antikörpern in der Probe wird ein Sandwichkomplex ausgebildet und der Antikörper spezifisch nachgewiesen.

Weiterhin kann die erfindungsgemäße Festphase eine Kontrollfläche zum Nachweis des Gesamt-IgE-Gehalts enthalten. Eine solche Kontrollfläche ist insbesondere bei Allergie-Tests empfehlenswert. Bei der spezifischen IgE-Bestimmung in der Allergiediagnostik wird die spezifische Nachweisreaktion eines bestimmten IgE oftmals durch Proben mit hohem Gesamt-IgE-Gehalt gestört. Mit Hilfe einer Kontrollfläche, auf die Anti-IgE-Antikörper aufgebracht worden sind, kann parallel zum Nachweisverfahren der Gesamt-IgE-Gehalt bestimmt werden.

Schließlich können auch Kontrollflächen zum Nachweis von Störungen vorgesehen werden, die durch Reaktionen von Komponenten des Nachweismediums mit dem Festphasenträger hervorgerufen werden. Hierzu werden alle Bestandteile des Festphasenträgers, wie Trägermaterial (z.B. Polystyrol), Weichmacher, funktionelle Gruppen usw. auf eine Kontrollfläche aufgebracht.

Außerdem können bei bestimmten Testverfahren, z.B. bei qualitativen oder semi-quantitativen Tests auf Infektionskrankheiten, Allergien etc. Kontrollflächen zur Ermittlung eines Cut-off Werts verwendet werden. Der "Cut-off"-Wert ist ein Grenzwert, der bei Testverfahren gesetzt wird, um zwischen positiven und negativen Werten unterscheiden zu können. Ein solcher "Cut-off"-Wert ist insbesondere bei Testverfahren, welche Infektionskrankheiten betreffen, von Bedeutung. Zum einen kann eine "Negativ"-Kontrollfläche verwendet werden, die eine Beladelösung ohne das Testreagenz oder ein Mutein des Testreagenzes enthalten kann. Der große Vorteil liegt darin, daß für jede Probe ein probenspezifischer Wert der unspezifischen Bindung erfaßt wird und somit eine verbesserte Spezifität des Tests erhalten wird. Auf diese Weise kann eine separate Negativkontrolle entfallen.

Abbildung 2 zeigt die Wirkung einer Kontrollfläche beim Einsatz in einem Test, bei dem ein Cut-off-Wert verwendet wird. Bei einer großen Anzahl von Proben wird bei einer konventionellen Testdurchführung eine gewisse Anzahl falsch negativer und falsch positiver Ergebnisse erhalten (linke Seite). Bei der erfindungsgemäßen Verwendung von Kontrollflächen (rechte Seite) kann eine selektive Verringerung der Signale aus negativen Proben erzielt werden, was zu einer Verringerung des

- 11 -

Cut-off-Werts führt. Auf diese Weise kann eine positiv/negativ Unterscheidung mit erheblich geringerer Fehlerwahrscheinlichkeit getroffen werden.

Auch eine Positivkontrolle kann durch eine Referenzfläche, die den Analyten oder  
5 ein analytähnliches Reagenz enthält, simuliert werden. Der große Vorteil liegt darin, daß mit der Kombination von einer Negativ-Kontrollfläche mit einer Positiv-Referenzfläche ein probenspezifischer Cut-off-Wert für jede einzelne Messung bestimmt werden kann. Dies hat den Vorteil, daß keine indirekte Kalibrierung notwendig ist und eine bessere Testspezifität erreicht wird.

10

Es ist selbstverständlich möglich, neben den oben genannten bevorzugten Kontrollflächen je nach Testführung andere oder/und weitere Kontrollflächen vorzusehen, um in einer Probe vorhandene oder vermutete Störkomponenten zu erfassen.

15 Die erfindungsgemäß vorgesehenen Kontrollflächen ermöglichen nicht nur eine qualitative Erkennung von Störreaktionen, sondern oftmals auch eine quantitative Korrektur der Störung. Bei geeigneter Wahl der Testbedingungen wird gerade die in den Testflächen auftretende unspezifische Bindung von Nicht-Analytkomponenten in bestimmten Kontrollflächen abgebildet. Somit kann der Messwert in einer  
20 Testfläche einfach korrigiert werden, wodurch ein korrektes und unverfälschtes Ergebnis erhalten wird. Auch bei nicht identischer unspezifischer Bindung in der Testfläche und der Kontrollfläche, kann eine Korrektur des Meßsignals bei qualitativen Tests erfolgen, da hier nur eine Aussage über "positiv" oder "negativ" notwendig ist.

25

Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass es mit der erfindungsgemäßen Festphase möglich ist, ohne großen Aufwand das Vorliegen mehrerer Störkomponenten separat zu erkennen und es möglich ist, die Art der Störung zu bestimmen. Der Anwender erkennt unmittelbar, dass das Ergebnis aufgrund des Vorliegens einer  
30 oder mehrerer Störkomponenten verfälscht sein könnte. Der Anwender kann dann entweder anhand der ermittelten Daten die Messergebnisse korrigieren, die Mes-

sung mit einem anderen Testformat wiederholen oder die Probe in geeigneter Weise vorbehandeln, z.B. durch Abtrennung der Störkomponenten.

Die erfindungsgemäße Festphase kann zum Nachweis eines Analyten in einer Probe, z.B. in einer Körperflüssigkeit, wie etwa Blut, Serum, Plasma, Speichel etc. verwendet werden. Vorzugsweise werden Festphasen mit mehreren Testflächen, d.h. Array-Systeme, zum gleichzeitigen Nachweis mehrerer Analyten verwendet. Vorzugsweise wird in solchen Array-Systemen für jede Testfläche mindestens eine Kontrollfläche verwendet. Die erfindungsgemäßen Festphasen können in allen bekannten heterogenen Testverfahren eingesetzt werden, insbesondere bei Immunoassays und Nukleinsäurehybridisierungsassays.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist somit ein Verfahren zum Nachweis eines Analyten unter Verwendung einer Festphase mit mindestens einer begrenzten Testfläche, die weiterhin mindestens eine Kontrollfläche zum Nachweis von Störreaktionen umfaßt. Vorzugsweise enthält das erfindungsgemäße Verfahren die Verwendung der Kontrollflächen zur quantitativen Korrektur von Störungen.

Schließlich betrifft die Erfindung auch die Verwendung von Kontrollflächen in einem Verfahren zum Nachweis eines Analyten zur gleichzeitigen Erkennung von Störungen.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Abbildungen und Beispiele näher erläutert. Es zeigen:

25

Abbildung 1: ein Beispiel für ein miniaturisiertes Array-System (Microspot), das unter Verwendung einer universellen Markierungsgruppe die gleichzeitige Bestimmung von 3 Parametern auf einer Festphase erlaubt;

Abbildung 2: die Spezifitätsverbesserung, die in Testformaten, bei denen ein Cut-off-Wert bestimmt wird, durch die erfindungsgemäße Verwendung von Kontrollflächen erzielt wird und

30

- 13 -

Abbildung 3: die schematische Darstellung einer erfindungsgemäßen Festphase zur Bestimmung von HBs-Antigen, die neben der Testfläche (<HBsAg>) zusätzlich mehrere Kontrollflächen (<CK-MB>; <TNT> und <TSH>) enthält.

5

## Beispiele

### Beispiel 1 Durchführung eines HBsAg-Tests

- 10 Auf einen Polystyrolträger wird auf eine Testfläche von ca. 100  $\mu\text{m}$  ein monoklonaler Antikörper gegen HBsAg aufgebracht. Durch mehrmaliges Aufbringen der identischen Reagenzlösung kann ohne Mehraufwand bei der Testdurchführung pro Probenpipettierung eine Mehrfachbestimmung durchgeführt werden. Auf die Testfläche werden 30  $\mu\text{l}$  mit Probenpuffer vorverdünnte Probe pipettiert und 20
- 15 Minuten unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Absaugen der Probe und Waschen des Testfeldes mit Waschpuffer werden 30  $\mu\text{l}$  Reagenzlösung 1 mit Digoxigenin (Dig)-markiertem Anti-HBsAg-Antikörper zupipettiert und wiederum 20 Minuten unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Absaugen der Reagenzlösung 1 und Waschen des Testfeldes mit Waschpuffer werden 30  $\mu\text{l}$
- 20 Reagenzlösung 2 mit Nachweisreagenz auf das Testfeld pipettiert. Als Nachweisreagenz dienen 100 nm große, fluoreszenzgefärbte Latexpartikel, die kovalent mit einem Anti-Dig-Antikörper beschichtet sind. Dieses Nachweisreagenz wird wiederum 20 Minuten unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend abgesaugt, gewaschen und trockengesaugt. Das Testfeld wird mit einem He-Ne-
- 25 Laser mit 633 nm Wellenlänge bestrahlt und die Fluoreszenz bei 670 nm Wellenlänge mit einer CCD-Kamera vermessen. Eine schematische Darstellung dieses Testformates ist in Abb. 1 Mitte gezeigt.

Folgende testspezifischen Reagenzien wurden verwendet:

30

Festphasenantikörper: Monoklonaler Maus Anti-HBsAg-Antikörper-1 (Fab'<sub>2</sub>-Fragment)-Biotin-Konjugat 1:1 Subtyp IgG1

Nachweisantikörper: Monoklonaler Maus Anti-HBsAg-Antikörper-2 IgG-Dig-Konjugat 1:10

Folgende Meßwerte (Counts) wurden gemessen:

5

Probe	Negativ-Kontrollfeld (Counts)	Signal Testfeld (Counts)	Signal Testfeld - Negativ-Kontrollfeld	Cut-off-Index**
Negativkontrolle	22	22	0	0,0
Positivkontr.1 (20 U/ml)	20	5459	5439	82,4
10 Positivkontr.2 (3 U/ml)	27	760	733	11,1
Negativprobe 1	15	15	0	0,0
Negativprobe 2	15	15	0	0,0
Negativprobe 3	14	14	0	0,0
15 Negativprobe 4	15	15	0	0,0
Negativprobe 5	15	15	0	0,0
Negativprobe 6	17	17	0	0,0

\* Negativ-Kontrollfeld entspricht unspezifischer Bindung im Kontrollfeld ohne Festphasenrezeptor

20 \*\* Cut-off-Index:  $[\text{Signal (Testfeld)} - \text{Signal (Negativ-Kontrollfeld)}] / 3 \times \text{Signal (Negativ-Kontrolle)}$

Bei einem Cut-off > 1 ist der Test positiv. Bei einem Cut-off < 1 ist der Test negativ.

## 25 Beispiel 2: HBsAg-Test mit Kontrollspots zur Detektion von HAMA-Störern

Zur Detektion von HAMA-Störern wurden neben HBsAg-spezifischem Antikörper weitere unspezifische monoklonale Antikörper (MAKs) zur Detektion von HAMA-Störern aufgebracht (siehe Abbildung 3). Dabei wurden Antikörper gegen Creatinkin-



- 15 -

nase-MB (<CK-MB>), Troponin T (<TNT>) und Thyroid-stimulierendes Hormon (<TSH>) in Form von Fab'<sub>2</sub>- oder Fab'-Biotin-Konjugaten eingesetzt. Aufgrund der Tatsache, daß die humanen Anti-Maus-Antikörper in der Probe eine Vernetzung des an der Festphase gebundenen unspezifischen MAKs und des spezifischen Nachweisantikörpers hervorrufen, kann die sogenannte HAMA-Störung nachgewiesen werden. Ziel des Versuches war es, den optimalen MAK zur HAMA-Detektion zu finden. Das HBsAg/Kontroll-Panel wurde mit 6 verschiedenen HAMA-Proben vermessen. Dazu wurden dem Probenpuffer kein bzw. 100 µg/ml HAMA-Entstörreagenz zugesetzt.

a) Versuchsergebnisse ohne HAMA-Entstörreagenz

Probe	MAK<HBsAg> F(ab') <sub>2</sub> -Bi 1:1 (Counts)	MAK<TSH> F(ab') <sub>2</sub> -Bi 1:1 (Counts)	MAK<TNT> Fab'-Bi 1:1 (Counts)	MAK<CK-MB> Fab'-Bi 1:1 (Counts)	Cut-off- Index** HBsAg
Neg-Kontr	3	18	0	10	0,04
Pos-Kontr (20 U/ml)	6169	23	0	5	73,4
HAMA 1	1598	2808	741	177	19,0
HAMA 2	4889	10434	306	42	58,2
HAMA 3	737	3728	29	32	8,8
HAMA 4	358	2513	0	0	4,3
HAMA 5	43	2565	0	0	0,5
HAMA 6	32157	32108	32717	32930	382,8

\* Signal (Testfeld)-Signal (Neg.-Kontrollfeld)

\*\* Cut-off-Index = [Signal (Testfeld)-Signal (Negativ-Kontrollfeld)]/3 x Signal (Negativkontrolle)  
Signal (Negativkontrolle) = 28 Counts

- 16 -

Dieses Ergebnis zeigt, daß der HBsAg-Test durch 5 der 6 HAMA-Proben stark gestört wird und zu einem falsch positiven Ergebnis führt. Durch die Anwesenheit der Kontrollspots kann die Störung eindeutig angezeigt werden. Am besten eignet sich dafür der TSH-MAK, der das identische Spaltfragment (Fab'<sub>2</sub>), die identische Biotin-Stöchiometrie und die identische Kopplungschemie aufweist. Die beiden MAKs mit Fab'-Fragmenten reagieren dagegen schlechter als der HBsAg-MAK mit den HAMA-Störproben und sind deshalb zur Identifizierung von allen HAMA-Störern weniger geeignet.

10 b) Versuchsergebnisse mit 100 µg/ml HAMA-Entstörreagenz

Probe	MAK<HBsAg> F(ab') <sub>2</sub> -Bi 1:1' (Counts)	MAK<TSH> F(ab') <sub>2</sub> -Bi 1:1' (Counts)	MAK<TNT> Fab'-Bi 1:1' (Counts)	Cut-off- Index** HBsAg	Cut-off- Index HBsAg <sub>korrt</sub> ***
Neg-Kontr	0	0	0	0,0	0,0
15 Pos-Kontr (20 U/ml)	4186	0	0	41,0	41,0
HAMA 1	0	0	0	0,0	0,0
HAMA 2	0	0	0	0,0	0,0
HAMA 3	0	0	0	0,0	0,0
HAMA 4	0	0	0	0,0	0,0
20 HAMA 5	0	0	0	0,0	0,0
HAMA 6	144	187	217	1,4	0,0

\* Signal (Testfeld) - Signal (Negativkontrollfeld)

\*\*Cut-off-Index = [Signal (Testfeld) - Signal (Negativ-Kontrollfeld)]/3 x Signal (Negativkontrolle)

25 Signal (Negativkontrolle) = 34 Counts

\*\*\* Cut-off-Index HBsAg<sub>korrt</sub> = [Signal (Testfeld) - Signal (MAK-Kontrollfeld)]/3x Signal (Negativkontrolle); Definition: negative Werte = 0

- 17 -

Durch den Zusatz von einer sehr großen Menge von 100  $\mu\text{g/ml}$  Entstörreagenz, die den Test für Routineanwendungen zu teuer machen würde, können zwar 5 der 6 HAMA-Proben entstört werden. Ein Problem bleibt allerdings die HAMA-Probe 6, die trotz der hohen Konzentration an Entstörreagenz nicht entstört werden kann.

5 Mit Hilfe der beiden Kontrollspots kann die noch vorhandene HAMA-Störung deutlich angezeigt werden. Da die unspezifische Bindung im TSH-Kontrollspot der unspezifischen Bindung im spezifischen HBsAg-Spot entspricht, kann das spezifische Signal mit Hilfe des Signals im Kontrollspot korrigiert werden. Mit dieser Maßnahme wird auch diese Probe eindeutig negativ, was zu einer deutlichen

10 Verbesserung der Spezifität führt. Daher können mit Hilfe der Kontrollspots unter Verbesserung der Spezifität die Konzentrationen an Entstörprotein im Probenpuffer und somit die Herstellungskosten deutlich gesenkt werden.

### **Beispiel 3: HBsAg-Test mit Kontrollspots zur Detektion von probenspezifischen Matrixeffekten**

Es ist allgemein bekannt, daß in Bindungsassays durch unterschiedliche Matrixeffekte unspezifische Bindungen des Nachweisreagenz hervorgerufen werden können. Durch das Aufbringen von Kontrollspots, die ein vergleichbares Verhalten

20 gegenüber Matrixeffekten wie der testspezifische Spot aufweisen, ist es möglich, solche Matrixeffekte anzuzeigen und gegebenenfalls sogar zu korrigieren. Dies führt folglich zu einer deutlichen Verbesserung der Spezifität.

Im nachfolgenden Versuch wurde wiederum ein HBsAg-Test mit verschiedenen

25 HBsAg-negativen Proben vermessen, die aufgrund von auffälligen Matrixeffekten ausgewählt wurden.

- 18 -

Probe	MAK<HBsAg> F(ab') <sub>2</sub> -Bi 1:1 (Counts)	MAK<TSH> F(ab') <sub>2</sub> -Bi 1:1 (Counts)	Cut-off-Index** HBsAg	Cut-off-Index HBsAg <sub>korrt</sub> ***
Neg-Kontrolle	3	18	0,04	0,0
Pos-Kontrolle (20 U/ml)	6169	23	73,4	73,2
Negativprobe 3415	0	0	0,0	0,0
Negativprobe 3418	65	102	0,77	0,0
Negativprobe 4561	128	494	1,52	0,0
Negativprobe 4567	158	328	1,88	0,0
Negativprobe 4609	0	0	0,0	0,0
Negativprobe S21	25	52	0,30	0,0
Negativprobe S25	4	3	0,05	0,01
Negativprobe S45	16	30	0,19	0,0
Negativprobe S49	0	0	0,0	0,0

\* Signal (Testfeld) - Signal (Negativkontrollfeld)

\*\* Cut-off-Index = [Signal (Testfeld) - Signal (Negativkontrollfeld)]/3 x Signal (Negativkontrolle)

Signal (Negativkontrolle) = 28 Counts

\*\*\* Cut-off-Index HBsAg<sub>korrt</sub> = [Signal (Testfeld) - Signal (MAK-Kontrollfeld)]/3 x Signal (Negativkontrolle); Definition negative Werte = 0

Von den vermessenen 9 auffälligen Negativproben führen 2 Proben zu falsch-positiven Ergebnissen. Durch Korrektur des Meßwerts mit Hilfe des Kontrollspots werden alle Proben auf Null gebracht und sind somit eindeutig negativ.

**Beispiel 4: HBsAg-Test mit Kontrollflächen zur Detektion von Störungen durch Rheumafaktoren**

Zur Detektion einer Störung durch Rheumafaktoren wurden neben dem HBsAg-spezifischen Antikörper weitere MAKs vom Subtyp IgG1 aufgebracht. Aufgrund der  
5 Tatsache, daß Rheumafaktoren mit dem Fc-Teil von Antikörpern reagieren, kann eine Vernetzung des an der Festphase gebundenen testspezifischen MAKs und des spezifischen Nachweisantikörpers hervorgerufen und somit eine falsch positive Reaktion erzeugt werden. Ziel des Versuches war es, den optimalen MAK zur  
10 Detektion von Rheumafaktoren zu finden. Aus diesem Grund wurden unterschiedliche MAKs der Subklasse IgG1 aufgetragen. Dieses HBsAg/Kontroll-Panel wurde mit einer Negativkontrolle, 3 verschiedenen Positivkontrollen, 4 normalen Negativproben und 5 Negativproben mit ansteigenden Rheumafaktoren (RF 1-5) vermessen. Der jeweilige Gehalt der Positivkontrollen an HBsAg und der Gehalt der  
15 Rheumafaktorproben an Rheumafaktoren ist in U/ml angegeben. Die Ergebnisse waren wie folgt:

Probe	MAK <HBsAg> IgG-Bi [Counts]	MAK<IgE> "1"-IgG-Bi [Counts]	MAK<IgE> "2"-IgG-Bi [Counts]	MAK<IgE> "3"-IgG-Bi [Counts]	Negativ- kontroll- feld* [Counts]	Cut-off- Index* HBsAg
Neg-Kontr	27	34	31	30	27	0,0
5 Pos-Kontr (20 U/ml)	4701	44	44	44	44	57,5
Pos-Kontr (5 U/ml)	842	43	43	43	43	9,9
Pos-Kontr (0,1 U/ml)	106	31	31	31	31	0,9
10 Neg-Probe1	30	35	30	30	30	0,0
Neg-Probe2	28	33	33	34	28	0,0
Neg-Probe3	29	35	29	29	29	0,0
Neg-Probe4	27	32	27	27	27	0,0
15 RF 1 (307 U/ml)	39	34	29	30	27	0,15
RF 2 (421 U/ml)	41	33	28	28	28	0,16
RF 3 (1307 U/ml)	429	33	115	64	30	4,9
20 RF 4 (1793 U/ml)	5790	47	865	204	47	70,9
RF 5 (2599 U/ml)	7530	106	2527	759	54	92,3

25 \* Cut-off-Index = [Signal (Testfeld)-Signal (Negativ-Kontrollfeld)]/3 x Signal (Negativkontrolle)  
Cut-off-Index > 1 = positiv

- 21 -

Dieses Beispiel zeigt deutlich, daß Negativproben mit einer Konzentration an Rheumafaktoren  $> 1000$  U/ml den HBsAg-Test deutlich stören und ein falsch positives Ergebnis liefern. 2 der 3 geprüften MAK-Kontrollflächen simulieren die Störung des HBsAg-Tests und liefern ebenfalls deutlich positive Reaktionen mit den 3 hochtitrigen Rheumaseren. Auf diese Weise wird die Teststörung sofort 5 erkannt, so daß ein falschpositives Ergebnis vermieden wird. Am besten ist der MAK "2" geeignet, um die Rheumafaktorstörung anzuzeigen.

### Ansprüche

1. Festphase mit mindestens einer begrenzten Testfläche zum Nachweis eines  
5 Analyten in einer Probe,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß sie weiterhin mindestens eine begrenzte Kontrollfläche zum Nachweis von Störungen umfaßt.
- 10 2. Festphase nach Anspruch 1,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass sie mehrere Testflächen zum gleichzeitigen Nachweis mehrerer Analyten in einer Probe umfaßt.
- 15 3. Festphase nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass sie mindestens eine Kontrollfläche zum Nachweis von Störungen umfaßt, die durch eine nicht-analytspezifische Bindung von Komponenten des Nachweismediums an die Testfläche hervorgerufen werden.
- 20 4. Festphase nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass sie mindestens eine Kontrollfläche zum Nachweis von Störungen umfaßt, die durch eine nicht-analytspezifische Bindung von Komponenten  
25 des Nachweismediums an den Festphasenrezeptor auf einer Testfläche hervorgerufen werden.
5. Festphase nach Anspruch 3 oder 4  
**dadurch gekennzeichnet,**  
30 dass sie mindestens eine Kontrollfläche zum Nachweis von Störungen umfaßt, die durch eine nicht-analytspezifische Bindung von Komponenten des Nachweismediums an immobilisierte Antikörper, Antikörperfragmente,



Antigene oder/und Nukleinsäuren auf einer Testfläche hervorgerufen werden.

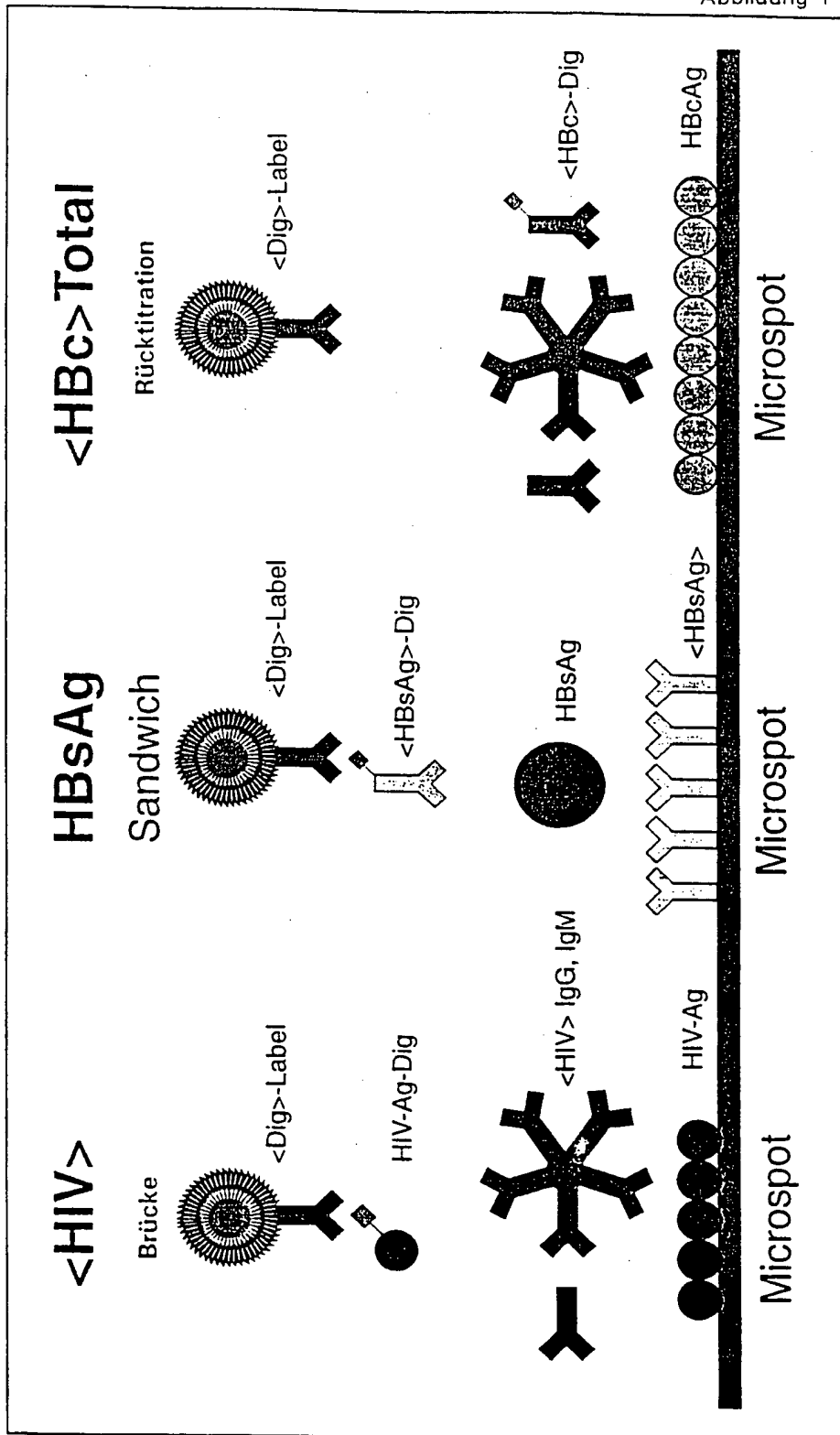
6. Festphase nach Anspruch 4 oder 5,  
5 **dadurch gekennzeichnet,**  
daß die Kontrollfläche einen modifizierten Festphasenrezeptor enthält, der sich von einem Festphasenrezeptor auf einer Testfläche durch das Fehlen einer analytspezifischen Bindungsstelle unterscheidet.
- 10 7. Festphase nach Anspruch 4, 5 oder 6,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass sie mindestens eine Kontrollfläche zum Nachweis von Störungen durch Rheumafaktoren umfaßt.
- 15 8. Festphase nach Anspruch 4, 5 oder 6,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass sie mindestens eine Kontrollfläche zum Nachweis von Störungen durch fremdspezies-spezifische Antikörper umfaßt.
- 20 9. Festphase nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass sie mindestens eine Kontrollfläche zum Nachweis von Störungen umfaßt, die durch die unspezifische Bindung von Komponenten des Nachweismediums an nicht-analytspezifische Substanzen auf dem Festphasen-  
25 träger hervorgerufen werden.
10. Festphase nach Anspruch 9,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass sie mindestens eine Streptavidin enthaltende Testfläche und mindestens eine Kontrollfläche zum Nachweis von Störungen durch nicht-analyt-  
30 spezifische Streptavidin-bindende Komponenten des Nachweismediums umfaßt.

11. Festphase nach Anspruch 3,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass sie mindestens eine Kontrollfläche zum Nachweis des Gesamt-IgE-  
Gehalts umfaßt.
- 5 12. Festphase nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß sie weiterhin mindestens eine Positiv-Referenzfläche mit dem zu  
bestimmenden Analyten umfaßt.
- 10 13. Festphase nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß die Testflächen und Kontrollflächen jeweils einen Durchmesser von  
10  $\mu\text{m}$  bis 1 cm aufweisen.
- 15 14. Verwendung einer Festphase nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zum  
Nachweis eines Analyten in einer Probe.
- 20 15. Verwendung nach Anspruch 14,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß die Festphase mehrere Testflächen zum gleichzeitigen Nachweis  
mehrerer Analyten umfaßt.
16. Verwendung nach Anspruch 14 oder 15 in einem Immunoassay.
- 25 17. Verwendung nach Anspruch 14 oder 15 in einem Nukleinsäure-Hybridisie-  
rungsassay.
- 30 18. Verfahren zum Nachweis eines Analyten unter Verwendung einer Festphase  
mit mindestens einer begrenzten Testfläche, die weiterhin mindestens eine  
begrenzte Kontrollfläche zum Nachweis von Störreaktionen umfaßt.

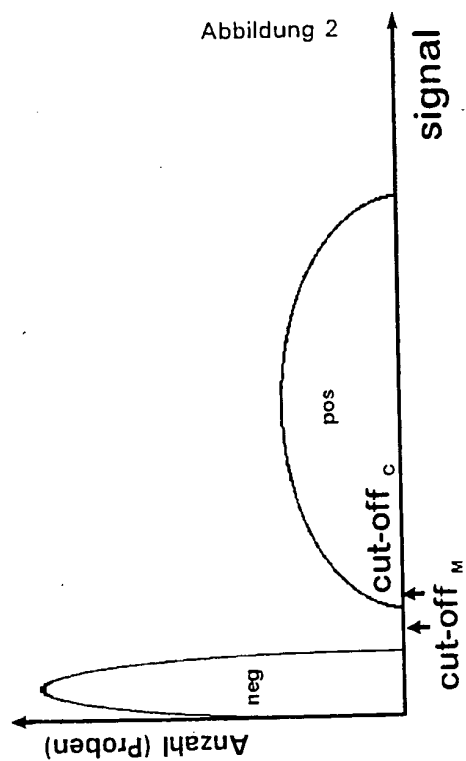
- 25 -

19. Verfahren nach Anspruch 18,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
dass die Kontrollflächen zur quantitativen Korrektur von Störungen verwendet werden.
- 5
20. Verwendung von begrenzten Kontrollflächen zur gleichzeitigen Erkennung und gegebenenfalls zur quantitativen Korrektur von Störungen in einem Verfahren zum Nachweis eines Analyten.
- 10

Abbildung 1



Test mit Kontrollfläche



Test ohne Kontrollfläche

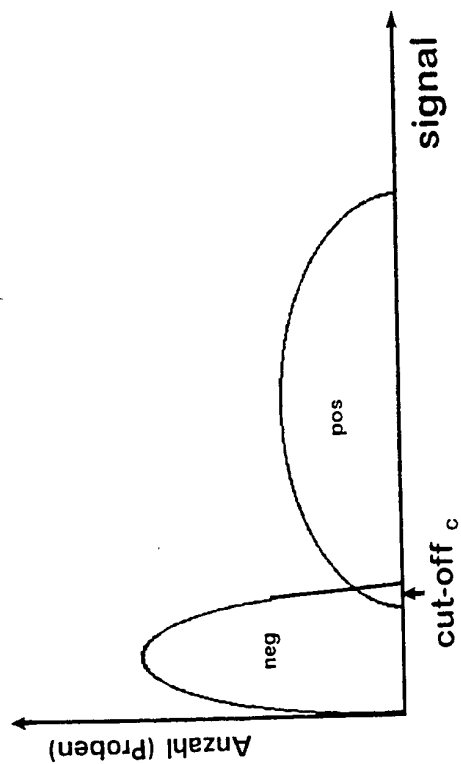
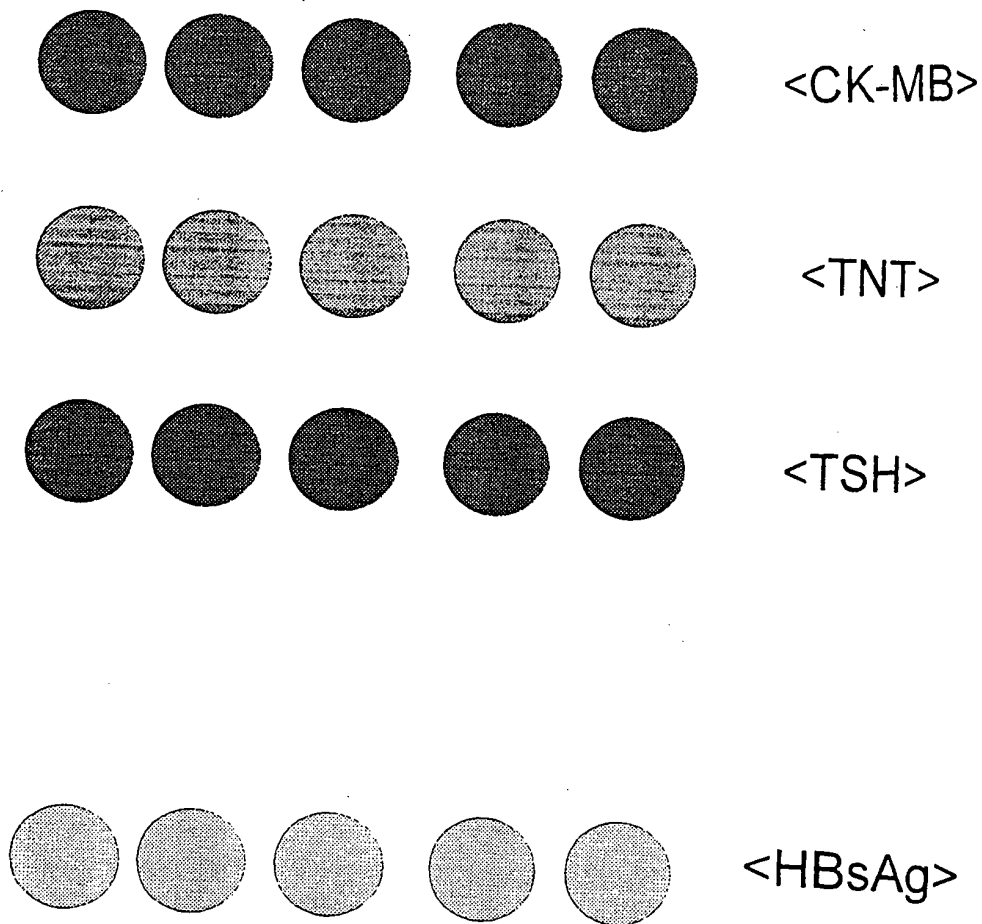


Abbildung 3

# HBsAg/Kontrollspot-Panel



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/04533

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 G01N33/543 G01N33/52 G01N33/576 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	US 5 160 701 A (BROWN III WILLIAM E ET AL) 3 November 1992 see column 4, line 37 - line 54  see column 5, line 16 - line 69 see column 10, line 18 - line 55 see column 11, line 2 - line 35 see claims 1,6,7,25 & US 4 916 056 A cited in the application --- -/--	1-3, 18-20 4,5, 12-17



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 January 1999

Date of mailing of the international search report

19/01/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gundlach, B

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 98/04533

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	US 4 558 013 A (MARINKOVICH VINCENT A ET AL) 10 December 1985 cited in the application see column 1, line 15 - line 24  see column 2, line 7 - line 61 see column 3, line 3 - line 22 see column 4, line 12 - line 38; claims 1,7	1-3, 18-20  4,5, 11-16
X A	US 5 356 785 A (MCMAHON PHILIP ET AL) 18 October 1994 cited in the application see column 1, line 20 - line 26 see abstract; claim 1	1-3, 18-20  12-14
P,A	US 5 705 353 A (KIM JULIE S ET AL) 6 January 1998 see column 1, line 31 - line 35 see column 2, line 23 - line 57 see column 5, line 36 - line 41	1-8, 18-20
A	WO 96 14338 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH ;KLEMT VOLKER (DE); SCHLIEPER DITTMAR (DE)) 17 May 1996 see page 1, line 1 - page 6, line 10	1,7
A	EP 0 331 068 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 6 September 1989 see page 2, line 5 - line 41; claim 1	1,7,8



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/04533

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5160701 A	03-11-1992	US 4916056 A	10-04-1990
		AT 116443 T	15-01-1995
		AU 3156489 A	28-09-1989
		CA 1332807 A	01-11-1994
		DE 68920176 D	09-02-1995
		DE 68920176 T	11-05-1995
		EP 0335244 A	04-10-1989
		ES 2068844 T	01-05-1995
		JP 1299464 A	04-12-1989
		JP 2818191 B	30-10-1998
		AU 613797 B	08-08-1991
		AU 4170289 A	10-05-1990
		AU 593285 B	08-02-1990
		AU 6350286 A	09-04-1987
		CA 1281642 A	19-03-1991
		CA 1301648 A	26-05-1992
		DE 3686116 A	27-08-1992
		DE 3687276 A	21-01-1993
		EP 0217403 A	08-04-1987
		EP 0389003 A	26-09-1990
		GR 862328 A	19-01-1987
		JP 1879967 C	21-10-1994
		JP 5088785 B	24-12-1993
		JP 62228167 A	07-10-1987
		JP 2514878 B	10-07-1996
		JP 6050973 A	25-02-1994
		JP 5180841 A	23-07-1993
		KR 9402520 B	25-03-1990
		US 5008080 A	16-04-1991
		US 5149622 A	22-09-1992
US 4558013 A	10-12-1985	NONE	
US 5356785 A	18-10-1994	AT 120008 T	15-04-1995
		DE 68921650 D	20-04-1995
		DE 68921650 T	26-10-1995
		EP 0325449 A	26-07-1989
		JP 1245157 A	29-09-1989
US 5705353 A	06-01-1998	NONE	
WO 9614338 A	17-05-1996	DE 4439452 A	09-05-1996
		AU 691995 B	28-05-1998
		AU 3980195 A	31-05-1996
		WO 9614337 A	17-05-1996
		EP 0782585 A	09-07-1997
		EP 0789714 A	20-08-1997
		FI 971883 A	02-05-1997
		JP 10508593 T	25-08-1998
		JP 10508692 T	25-08-1998
		NO 971873 A	23-04-1997
		US 5804391 A	08-09-1998
EP 0331068 A	06-09-1989	US 4914040 A	03-04-1990
		AU 3090889 A	07-09-1989
		DD 280396 A	04-07-1990
		DE 3905505 A	14-09-1989
		DK 96689 A	04-09-1989

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/04533

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0331068 A		ES 2045216 T	16-01-1994
		FI 891012 A,B,	04-09-1989
		GR 3006991 T	30-06-1993
		HU 212322 B	28-05-1996
		IE 62974 B	08-03-1995
		JP 1254869 A	11-10-1989
		JP 2109086 C	21-11-1996
		JP 8023560 B	06-03-1996
		LV 10538 A	20-02-1995
		LV 10538 B	20-12-1995
		PT 89889 A,B	10-11-1989
		RU 2032906 C	10-04-1995

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/04533

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 G01N33/543 G01N33/52 G01N33/576 C1201/68

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff genorende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X A	US 5 160 701 A (BROWN III WILLIAM E ET AL) 3. November 1992 siehe Spalte 4, Zeile 37 - Zeile 54  siehe Spalte 5, Zeile 16 - Zeile 69 siehe Spalte 10, Zeile 18 - Zeile 55 siehe Spalte 11, Zeile 2 - Zeile 35 siehe Ansprüche 1.6, 7.25 & US 4 916 056 A in der Anmeldung erwähnt --- -/--	1-3, 18-20 4,5, 12-17

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

11. Januar 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

19/01/1999

Name und Postanschnitt der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Gundlach, B

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/04533

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitrag, Anspruch Nr.
X A	US 4 558 013 A (MARINKOVICH VINCENT A ET AL) 10. Dezember 1985 in der Anmeldung erwähnt siehe Spalte 1. Zeile 15 - Zeile 24  siehe Spalte 2. Zeile 7 - Zeile 61 siehe Spalte 3. Zeile 3 - Zeile 22 siehe Spalte 4. Zeile 12 - Zeile 38; Ansprüche 1,7	1-3, 18-20  4,5, 11-16
X A	US 5 356 785 A (MCMAHON PHILIP ET AL) 18. Oktober 1994 in der Anmeldung erwähnt siehe Spalte 1. Zeile 20 - Zeile 26 siehe Zusammenfassung; Anspruch 1	1-3, 18-20  12-14
P, A A	US 5 705 353 A (KIM JULIE S ET AL) 6. Januar 1998 siehe Spalte 1. Zeile 31 - Zeile 35 siehe Spalte 2. Zeile 23 - Zeile 57 siehe Spalte 5. Zeile 36 - Zeile 41  WO 96 14338 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH ;KLEMT VOLKER (DE); SCHLIEPER DITTMAR (DE) 17. Mai 1996 siehe Seite 1. Zeile 1 - Seite 6, Zeile 10	1-8, 18-20     1,7
A	EP 0 331 068 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 6. September 1989 siehe Seite 2. Zeile 5 - Zeile 41; Anspruch 1	1,7,8

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/04533

m Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5160701 A	03-11-1992	US 4916056 A	10-04-1990
		AT 116443 T	15-01-1995
		AU 3156489 A	28-09-1989
		CA 1332807 A	01-11-1994
		DE 68920176 D	09-02-1995
		DE 68920176 T	11-05-1995
		EP 0335244 A	04-10-1989
		ES 2068844 T	01-05-1995
		JP 1299464 A	04-12-1989
		JP 2818191 B	30-10-1998
		AU 613797 B	08-08-1991
		AU 4170289 A	10-05-1990
		AU 593285 B	08-02-1990
		AU 6350286 A	09-04-1987
		CA 1281642 A	19-03-1991
		CA 1301648 A	26-05-1992
		DE 3686116 A	27-08-1992
		DE 3687276 A	21-01-1993
		EP 0217403 A	08-04-1987
		EP 0389003 A	26-09-1990
		GR 862328 A	19-01-1987
		JP 1879967 C	21-10-1994
		JP 5088785 B	24-12-1993
		JP 62228167 A	07-10-1987
		JP 2514878 B	10-07-1996
		JP 6050973 A	25-02-1994
		JP 5180841 A	23-07-1993
		KR 9402520 B	25-03-1990
		US 5008080 A	16-04-1991
		US 5149622 A	22-09-1992
US 4558013 A	10-12-1985	KEINE	
US 5356785 A	18-10-1994	AT 120008 T	15-04-1995
		DE 68921650 D	20-04-1995
		DE 68921650 T	26-10-1995
		EP 0325449 A	26-07-1989
		JP 1245157 A	29-09-1989
US 5705353 A	06-01-1998	KEINE	
WO 9614338 A	17-05-1996	DE 4439452 A	09-05-1996
		AU 691995 B	28-05-1998
		AU 3980195 A	31-05-1996
		WO 9614337 A	17-05-1996
		EP 0782585 A	09-07-1997
		EP 0789714 A	20-08-1997
		FI 971883 A	02-05-1997
		JP 10508593 T	25-08-1998
		JP 10508692 T	25-08-1998
		NO 971873 A	23-04-1997
		US 5804391 A	08-09-1998
EP 0331068 A	06-09-1989	US 4914040 A	03-04-1990
		AU 3090889 A	07-09-1989
		DD 280396 A	04-07-1990
		DE 3905505 A	14-09-1989
		DK 96689 A	04-09-1989

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 98/04533

In dem Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglieder der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0331068 A		ES 2045216 T	16-01-1994
		FI 891012 A, B	04-09-1989
		GR 3006991 T	30-06-1993
		HU 212322 B	28-05-1996
		IE 62974 B	08-03-1995
		JP 1254869 A	11-10-1989
		JP 2109086 C	21-11-1996
		JP 8023560 B	06-03-1996
		LV 10538 A	20-02-1995
		LV 10538 B	20-12-1995
		PT 89889 A, B	10-11-1989
		RU 2032906 C	10-04-1995

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie) (Juli 1992)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**